Aus dem Diabetes-Forschungsinstitut
an der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. F. A. Gries

UNTERSUCHUNGEN ZU EINEM NEUENTDECKTEN GLYKOSAMINOGLYKAN IM SERUM VON DIABETIKERN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
INA-CHRISTIANE HOPPE

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543915_0104

Aus dem Diabetes-Forschungsinstitut
an der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. F.A. Gries

Untersuchungen zu einem neu entdeckten Glykosaminoglykan im Serum von Diabetikern

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ina-Christiane Hoppe

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. H. Brüster

Referent
gez.: Prof. Dr. H. Kolb

Korreferent
gez.: Prof. Dr. H. Brüster

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung	1
Material und Methoden	6
1. Die Zusammenstellung der Serum-Pools	6
2. Gewinnung und Behandlung der Seren	7
3. Gelfiltration	7
4. Die gereinigte Substanz	8
5. Das in vitro-Testsystem	8
5.1. Gewinnung der Erythrozyten	9
5.2. Gewinnung der Peritonealzellen	9
5.3. Prüfung der Makrophagen-Vitalität	10
5.4. Der Zelladhäsionstest	10
6. Statistische Versuchsanordnung	11
Ergebnisse	12
1. Versuche zur Charakterisierung des gereinigten Faktors	12
1.1. Abhängigkeit der Hemmwirkung von der Faktorkonzentration	12
1.2. Lokalisierung der Bindungsstelle und Beurteilung der Bindungsstärke des Faktors an seinen Wirkort	13
1.3. Versuch einer Aufhebung der Hemmwirkung durch Perjodatoxidation des Faktors	14
2. Untersuchungen zum Faktorgehalt im Serum von Diabetikern	17
2.1. Auftrennung der Seren mit Hilfe von Gelfiltration und Lokalisation der hemmenden Fraktionen	17
2.2. Bestimmung der Faktorkonzentration bei Diabetikern verschiedenen Typs und verschiedener Stoffwechsellage im Vergleich zu einer Kontrollgruppe	19
Diskussion	23
Zusammenfassung	28
Literaturverzeichnis	30

EINLEITUNG

1981 entdeckten Nagamura et al. eine Substanz, die im Serum von Diabetikern in wesentlich höherer Konzentration vorkommt als im Serum von Normalpersonen.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Charakterisierung dieses Faktors; sie versucht weiter, Ansätze für eine mögliche klinische Bedeutung zu geben.

Nagamura et al. (1981) führten Säulenchromatographie von Serum diabetischer und nicht diabetischer Personen durch. Ihnen fiel dabei auf, daß während der Gefriertrocknung bestimmte Fraktionen stets Schaumbildung zeigten, und zwar bei Serum von Diabetikern mehr als bei Serum von Gesunden. Bei der Untersuchung, wie man die Konzentration und die biologische Wirksamkeit dieser in den Schaumfraktionen vorhandenen Substanz bestimmen könnte, stellte sich folgendes in vitro-Testsystem als geeignet heraus: Durch vorhergehende Phagozytose aktivierte Peritonealmakrophagen der Maus sind in der Lage, eigene - d.h. autologe - Erythrozyten spontan zu binden (Nagamura & Kolb, 1980 und 1981). Es werden überwiegend mehrere Erythrozyten an einen Makrophagen gebunden, so daß sich das optische Bild einer Rosette ergibt (siehe Abb. 1).

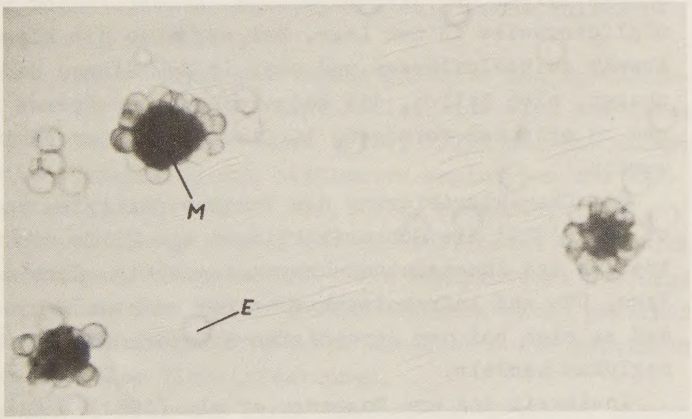


Abb. 1 Rosettenbildung zwischen Peritonealmakrophagen (M) und Erythrozyten (E).

Durch Zusatz des Schaumfaktors wird der Kontakt zwischen Makrophagen und Erythrozyten gehemmt. Damit stand ein einfacher Nachweistest zur Verfügung.

Der in dieser Methode eingesetzte "Rosettentest" wird in der Immunologie für die Analyse sehr verschiedener Arten des Zellkontaktes zwischen unterschiedlichen Reaktionspartnern verwendet. So können Lymphozyten, Makrophagen, Leberzellen u.a. Rosetten mit geeigneten Partnerzellen ausbilden, die gebundenen Zellen sind häufig Erythrozyten, aber auch Lymphozyten oder Bakterien (Jondal et al., 1975, Kolb & Kolb-Bachofen, 1978, Galili et al., 1978, Mayer et al., 1978). Als erster hat das Phänomen der Rosettenbildung Zaalberg (1964) beschrieben. Rosettenbildung als spezifischer Erkennungsmodus zwischen immunaktiven Zellen und körperfremden oder gealterten Zellen ist schon von verschiedenen Seiten untersucht worden (siehe u.a. Aminoff et al., 1977, Kolb & Kolb-Bachofen, 1978, Kolb et al., 1979, Nagamura & Kolb, 1980 und 81).

Nagamura et al. (1981) prüften im Rahmen ihrer Analyse der Rosettenbildung zwischen aktivierten Peritonealmakrophagen der Maus und Maus-Erythrozyten die Wirkung von Serum diabetischer Patienten und entdeckten dabei den hemmenden Effekt der Schaumfraktion. Dieser Faktor ist also möglicherweise in der Lage, bei der Maus die körpereigene Abwehr zu beeinflussen und zwar in dem Sinne, daß Makrophagen, also Zellen, die körpereigene und fremde Strukturen zu erkennen vermögen, in dieser Funktion behindert werden.

Zur Charakterisierung des Faktors reinigten Nagamura et al. (1981) die Schaumfraktionen mit Hilfe von Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie. Chemische Analyse, UV- und Infrarotspektrometrie machten wahrscheinlich, daß es sich bei der gereinigten Substanz um ein Glykosaminoglykan handelt.

Inwieweit das von Nagamura et al. (1981) entdeckte Phänomen auch von pathologischer Bedeutung beim Diabetes sein kann, ist noch offen.

Beim Diabetes mellitus handelt es sich um ein ätiologisch uneinheitliches Krankheitsbild. Nach klinischen Gesichts-

punkten unterscheidet man den Typ I-Diabetes = Insulinmangeldiabetes (juvenile Form) vom Typ II-Diabetes, bei dem die Menge sezernierten Insulins normal oder sogar erhöht ist (National Diabetes Data Group, 1979).

Beim Typ I-Diabetes liegt ein echter Insulinmangel vor auf der Basis fortschreitender Zerstörung der Langerhansschen B-Inselzellen. Bei 60 - 80 % der Betroffenen läßt sich eine Einwanderung von Lymphozyten in die Inseln im Sinne einer entzündlichen Reaktion in der Frühphase der Krankheit beobachten (Gepts, 1965). Für diese "Insulitis" werden folgende Ursachen diskutiert (Cahill & McDevitt, 1981):

- eine virale Infektion der Pankreas-Inselzelle (Gamble et al., 1973, Yoon et al., 1978 und 79, Craighead, 1979, Champsaur et al., 1980),
- autoimmune Reaktionen gegen Inselzellen; bei 60 - 90 % der neu entdeckten Insulinmangeldiabetiker finden sich Inselzellantikörper (Irvine et al., 1977, Dobersen et al., 1980, Kolb et al., 1980), deren pathogene Rolle aber noch keineswegs sicher ist (Kolb & Gries, 1981). Weiterhin gibt es nach Bottazzo & Doniach (1976) eine Untergruppe von Diabetikern, die autoimmune Polyendokrinopathien aufweist.

Ferner spielen auch genetische Faktoren bei der Pathogenese des Typ I-Diabetes eine Rolle. Dies wird zum einen durch Zwillingsuntersuchungen (Pyke, 1979) und zum anderen durch die Assoziation mit bestimmten Haplotypen des HLA-Systems deutlich (Nerup et al., 1974, Cudworth, 1978). D.h., daß genetische Marker des Typ I-Diabetes im Bereich der Gene liegen, die vermutlich die Immunantwort des Organismus steuern. Für Irvine (1979) steigern diese genetischen Faktoren die Empfänglichkeit der Inselzelle für Autoimmunprozesse und/oder Virusinfektionen.

Beim Typ II-Diabetes (auch Erwachsenen-Diabetes genannt) liegt keine echte Insulinmangelsituation aufgrund histologisch nachweisbarer Inselzellzerstörung vor. Es finden sich normale oder sogar erhöhte basale Insulinspiegel (Olefsky & Reaven, 1974), auf Glukose-Stimulus jedoch ist die Insu-

linausschüttung erniedrigt (Reaven et al., 1976). Außerdem findet man eine abgeschwächte Wirkung exogen zugeführten Insulins im Sinne einer Insulinresistenz (Ginsberg et al., 1975). Diese Resistenz der Effektorzellen wird mit einer Abnahme der Rezeptorzahl erklärt (Olefsky & Reaven, 1974).

Auch beim Typ II-Diabetes konnte, sogar in wesentlich stärkerem Maße als beim juvenilen Typ, eine erbliche Komponente nachgewiesen werden (Pyke, 1979). Es findet sich aber keine Assoziation zu HLA-Antigenen. Schliack (1954) fand, daß der Umweltfaktor Überernährung mit folgender Fettsucht bei der Pathogenese des Typ II eine Rolle spielt. Aufgrund dieser Befunde formuliert Hepp (1981) folgende hypothetische Kausalkette:

Auf dem Boden des Hyperinsulinismus der meist übergewichtigen Erwachsenen-Diabetiker kommt es zu einer sog. "down regulation" der Rezeptoren und damit zu einer verringerten Insulinempfindlichkeit der Zielorgane, die ihrerseits zu einer Erhöhung des Glukosespiegels führt.

Neben der verminderten Zahl von Rezeptoren spielt offenbar auch ein Defekt der Insulinwirkung auf intrazellulärer Ebene eine Rolle (Olefsky & Kolterman, 1981); es werden hier Veränderungen im Zellstoffwechsel, z.B. durch Variierung von Enzymaktivitäten diskutiert.

Der heutige Stand der Erkenntnis läßt es - wie beim Typ I - auch beim Erwachsenen-Diabetes nicht zu, von einer einheitlichen Ätiologie zu sprechen. Um so interessanter ist die Tatsache, daß die Komplikationen und Spätfolgen (wie z.B. Mikro- und Makroangiopathie) bei beiden Diabetes-Typen qualitativ gleich zu sein scheinen (Fajans,1981).

Die im folgenden beschriebenen eigenen Untersuchungen gehen in zwei verschiedene Richtungen:
Zum einen sollte die Charakterisierung der von Nagamura gereinigten Substanz weitergeführt werden; hierfür wurden erste Schritte unternommen, den Wirkungsmechanismus der Substanz im beschriebenen Testsystem zu analysieren. Zum anderen wurde versucht, die eventuelle klinische Bedeutung der Substanz zu beleuchten. Hierzu wurden Gruppen verschiedener Diabetestypen und Stoffwechseleinstellungen gebildet

und Serum-Pools dieser Gruppen mit Hilfe des Rosettentests auf ihren Gehalt an zellkontakt-hemmender Substanz untersucht.

Es sollte geprüft werden, ob Unterschiede im Schaumfaktorgehalt zu finden sind:

a) bei verschiedenen Diabetes-Typen,
b) in Abhängigkeit von der Stoffwechseleinstellung (gut eingestellter versus schlecht eingestellter Diabetiker).

MATERIAL UND METHODEN

1. Die Zusammenstellung der Serum-Pools

In Anlehnung an die derzeit gültige Einteilung des Diabetes (siehe Einleitung) wurden folgende Patientengruppen gebildet:

1) Patienten, deren Diabetes mit Insulin behandelt wird. Diese Gruppe umfaßt Personen, die in jugendlichem oder frühem Erwachsenenalter erkrankten.
2) Patienten, deren Diabetes mit oralen Antidiabetika oder mit Diät behandelt wird.

Innerhalb dieser beiden Gruppen erfolgte eine Unterteilung in Patienten mit gut eingestelltem Blutzuckerspiegel ≙ Nüchtern-Blutglukose ≤ 130 mg/100 ml Serum (markiert durch (+)) und solche mit unbefriedigender Stoffwechsellage ≙ Nüchtern-Blutzucker >170 mg/100 ml (durch (-) gekennzeichnet).
Die Daten der vier Kollektive gibt Tab.1 wieder. Es handelt sich um Mittelwerte (mit Angabe der Standardabweichung).

	TypI(-)	TypI(+)	TypII(-)	TypII(+)
Alter der Patienten (Jahre)	44 ± 18	41 ± 21	69 ± 11	60 ± 9
Dauer des Diabetes (Jahre)	15 ± 7	10 ± 10	11 ± 8	9 ± 6
Nüchtern-Blutzucker (mg/100 ml)	255 ± 72	109 ± 22	262 ± 47	108 ± 13
Glukosurie (g/24 h)	31 ± 44	0,2 ±0,3	27 ± 19	0,5 ± 1,2
$HbAI_c$ + (%)	12,5±2,3	§	12,9± 2,1	9,1 ± 2,0
Zahl der Patienten	13	10	15	10&

Tab. 1 Charakteristika der Patientengruppen

+ $HbAI_c$ ist der Anteil glukosylierten Hämoglobins. Er ist bei Diabetikern erhöht und gilt als Indikator für die Güte der Einstellung über einen größeren Zeitraum (Gonen & Rubenstein, 1978).

§ keine Werte vorhanden

& hiervon 2 Patienten nur diätetisch behandelt

Die aufgeführten Daten wurden den Krankenunterlagen der Patienten entnommen.

Als Kontrolle wurde Serum von zehn gesunden Personen (Angehörige des Diabetes-Institutes) gewonnen, bei denen ein manifester Diabetes anamnestisch ausgeschlossen wurde.

Damit ergeben sich fünf Serum-Pools:
1) Kontrollserum (K), 2) Serum insulinpflichtiger, schlecht eingestellter Diabetiker (Typ I(-)), 3) Serum insulinpflichtiger, gut eingestellter Diabetiker (Typ I (+)), 4) Serum nicht insulinpflichtiger, schlecht eingestellter Diabetiker (Typ II(-)) und 5) Serum nicht insulinpflichtiger, gut eingestellter Diabetiker (Typ II(+)).

2. Gewinnung und Behandlung der Seren

Patienten des Diabetes-Forschungsinstitutes Düsseldorf wurde morgens nach nächtlicher Nahrungskarenz 10 ml Venenblut entnommen. Das Blut, das keinen gerinnungshemmenden Zusatz enthielt, wurde innerhalb von 30 min bei Zimmertemperatur bei 3500 g 10 min zentrifugiert. Jeweils 1 ml-Portionen der so gewonnenen Seren wurden entsprechend der Gruppenzugehörigkeit zu Pools vereinigt und bei -18°C gelagert.

3. Gelfiltration

Mit Hilfe der Gelfiltration erfolgte die Trennung der Seren nach dem Molekulargewicht der in ihnen enthaltenen Stoffgruppen. Hierzu wurde eine Glassäule mit Kühlmantel (Fa. Pharmacia, Uppsala, Ø 1,6 cm, Länge 100 cm), gefüllt mit dem Trennmedium Sephadex G 50 (Pharmacia, Uppsala) benutzt. Sephadex ist ein vernetztes Polysaccharid; der Grad der Vernetzung bestimmt den Trennbereich. Sephadex G 50 hat einen Fraktionierbereich für Substanzen mit einem Molekulargewicht kleiner 10000. Bei der zu untersuchenden "Schaumsubstanz" handelt es sich um ein Molekül von der Größenordnung um 5000 d (Nagamura et al., 1981).

Das Serumgemisch wurde nach dem Auftauen noch einmal 5 min bei 3500 g zentrifugiert, um gelegentlich vorhandene Fibrinpolymere zu sedimentieren. Dann wurden 4,5 ml entnommen und mit 200 mg Saccharose (zur Erhöhung des

spezifischen Gewichts) und 0,2 ml Dextran-Blau (20 mg/ml H_2O) zur Markierung der Front gemischt. Nach vorsichtiger Auftragung auf die Säulenoberfläche begann die Elution mit 0,3 % NaCl in H_2O. Es wurden jeweils automatisch 5 ml-Fraktionen gesammelt. Die Elution war nach 50 Fraktionen beendet (Laufzeit der Säule: ca. 20 Stunden).

Die einzelnen Fraktionen wurden dann in einem Gemisch aus Trockeneis und Aceton eingefroren und anschließend bis zur Trockenheit lyophilisiert. Nach der Gefriertrocknung wurden sie bei -80°C gelagert. Die zu testenden Fraktionen wurden in je 1 ml 5 mM Phosphatpuffer in Eagle's Medium (mit Hanks-Salzen, ohne Natriumbikarbonat, ohne Glutamin von Fa. Flow, Bonn) gelöst. Somit wurde eine fünffache Konzentrierung der Fraktionen erreicht; auch die NaCl-Konzentration stieg dadurch auf 1,5 %.

Bei allen Serum-Pools waren es drei Fraktionen zwischen Nr. 31 und 35, die Schaumbildung zeigten.

4. Die gereinigte Substanz

Zur näheren Charakterisierung des Faktors wurden mir von Dr. Nagamura 7,5 mg der gereinigten Substanz als Lyophilisat zur Verfügung gestellt (Vorgehen bei der Reinigung, siehe Nagamura et al., 1981). Basierend auf einem Molekulargewicht von 5000 d wurde eine 10 mM Lösung durch Mischen mit 0,15 ml Eagle's Medium hergestellt. Diese diente als Stammlösung für die weiteren Versuche.

5. Das in vitro-Testsystem

Es wurden männliche und weibliche Mäuse des Stammes C57 BL/6J verwendet (Lieferant: Gl. Bomholtgard, Ry, Dänemark). Das Alter der Tiere zum Zeitpunkt des Experiments lag zwischen 2 und 6 Monaten.

Der Zelladhäsionstest wurde mit Peritonealmakrophagen und Erythrozyten des gleichen Tieres durchgeführt. Basismedium für alle Zellen war Eagle's Medium pH 7,2-7,4. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

5.1. Gewinnung der Erythrozyten

Zunächst wurde 0,1 ml Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus der Maus gewonnen und durch Zusatz von 0,1 ml 3,8 % Natriumcitrat (Fa. Merck, Darmstadt) ungerinnbar gemacht. Zur Entfernung des Plasmas und des Citrats wurden die Erythrozyten dreimal mit je 1 ml Eagle's Medium versetzt, 15 s bei 10^4 g sedimentiert und der Überstand jeweils verworfen. Durch Zusatz von 0,5 ml Eagle's Medium zum Erythrozytensediment nach der dritten Zentrifugation erhält man eine 10 %-ige Suspension. Für den Zelladhäsionstest wird ein Aliquod dieser Stammsuspension 1:10 mit Eagle's Medium verdünnt (ca. 10^8 Erythrozyten/ml).

5.2. Gewinnung der Peritonealzellen

Nach der Blutentnahme wurde der Maus 0,15 ml Tusche (India Ink Fa. G. Wagner, Hannover, gegen 0,9 %-ige NaCl-Lösung dialysiert) intraperitoneal injiziert. Nach 30 min wurden 6 ml Eagle's Medium intraperitoneal gespritzt und die Suspension dann mittels einer Stahlkanüle (Ø 1 mm) gewonnen. Die Suspension enthält dann: nicht phagozytierte Tusche, Lymphozyten, Peritonealmakrophagen (gekennzeichnet durch phagozytierte Tuschepartikel), sowie geringe Mengen von Erythrozyten. Die freien Tuschepartikel lassen sich durch dreimalige Zentrifugation bei 150 g für je 3 min entfernen; sie verbleiben im Überstand. Das Sediment wurde dabei jeweils mit 4 ml Eagle's Medium resuspendiert.

Die Zellzählung erfolgte in der Zählkammer (Neubauer) lichtmikroskopisch bei 250- bis 400-facher Vergrößerung. Zur leichteren Unterscheidung zwischen Makrophagen und Lymphozyten wurde die Zellsuspension 1:1 mit einer Kristallviolettlösung folgender Zusammensetzung gemischt: 0,44 mg/ml Kristallviolett (Fa. Serva, Heidelberg) + 0,7 % Rinderserumalbumin (Fa. Behring, Marburg) gelöst in Eagle's Medium. Die Lymphozyten sind dann blau gefärbt, die Makrophagen je nach Ausmaß der Tuschephago-

zytose teils schwarz gepunktet, teils tiefschwarz. Die gewünschte Makrophagenkonzentration lag zwischen 1 und 5 x 10^6/ml im definitiven Testansatz.

5.3. Prüfung der Makrophagen-Vitalität

20 µl der Zellsuspension wurden im Verhältnis 1:1 mit Trypan-Blau (0,1 % in 0,9 % NaCl, Fa. Gibco Bio-Cult, Karlsruhe) versetzt. Nicht vitale Zellen nehmen diesen Farbstoff auf. Die Zahl toter Makrophagen wurde lichtmikroskopisch bestimmt. Der Anteil gefärbter Zellen lag bei 8 %. Unter Verwendung von 40 mM Tricin-Puffer (N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin, Fa. Merck, Darmstadt) fand sich keine Steigerung der Zahl toter Makrophagen.

5.4. Der Zelladhäsionstest

50 µl der Makrophagensuspension wurden mit 50 µl der Säulenfraktionen bzw. 10 µl der gereinigten Substanz in der jeweils angegebenen Konzentration gemischt und 5 min bei 4°C inkubiert. In jedem Experiment wurde ein Kontrollansatz mitgeführt, der den Basiswert zur Bestimmung der Hemmwirkung des Faktors liefert. Hierzu wurde statt Faktor Eagle's Medium zugesetzt. Bei den Versuchen mit lyophilisierten Fraktionen wurden statt dessen 50 µl 1,5 % NaCl in 5 mM Phosphatpuffer zugefügt entsprechend der Kochsalzkonzentration in den zu testenden Fraktionen. Dann wurden 50 µl der 1 %-igen Erythrozytensuspension zugegeben. Die Ansätze wurden bei 80 g für 20 s zentrifugiert, um Zellkontakte zu erleichtern. Nach einer 1-stündigen Phase (4°C), in der sich die Rosettenbildung vollzieht, folgte die Auszählung. Der jeweilige Ansatz wurde durch vorsichtiges Bewegen des Röhrchens resuspendiert, dann wurden 50 µl entnommen und mit demselben Volumen Kristallviolettlösung (s.o.) gemischt. Die Bestimmung des Verhältnisses rosettenbildender Makrophagen zur Gesamtzahl geschah durch Auszählen von 100 Makrophagen. Als Rosette wurde die Bindung dreier

oder mehr als drei Erythrozyten an einen Makrophagen definiert. Die Basisrosettenbildung (ungehemmt) lag zwischen 30 und 50 %. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

6. Statistische Versuchsanordnung

1) Einfache Varianzanalyse[+]
Sie wurde mit den Variablen a) Kontrolle, b) Typ I(-), c) Typ II(-) durchgeführt.
2) Zweifache Varianzanalyse[+]
Folgende Faktoren wurden getestet:
a) Einfluß der Diabeteseinstellung, b) Einfluß der Behandlungsart.
Signifikanz wurde bei einem $p < 0,05$ zugrunde gelegt.

[+]siehe Weber, 1972

ERGEBNISSE

1. Versuche zur Charakterisierung des gereinigten Faktors

1.1. Abhängigkeit der Hemmwirkung von der Faktorkonzentration

Um quantitative Aussagen zur biologischen Aktivität der Substanz machen zu können, wurde zunächst getestet, in welchem Konzentrationsbereich sie ihre zelladhäsionshemmende Wirkung entfaltet. Hierzu wurden Faktorkonzentrationen in einem Bereich zwischen 0,1 und 10 µM untersucht.

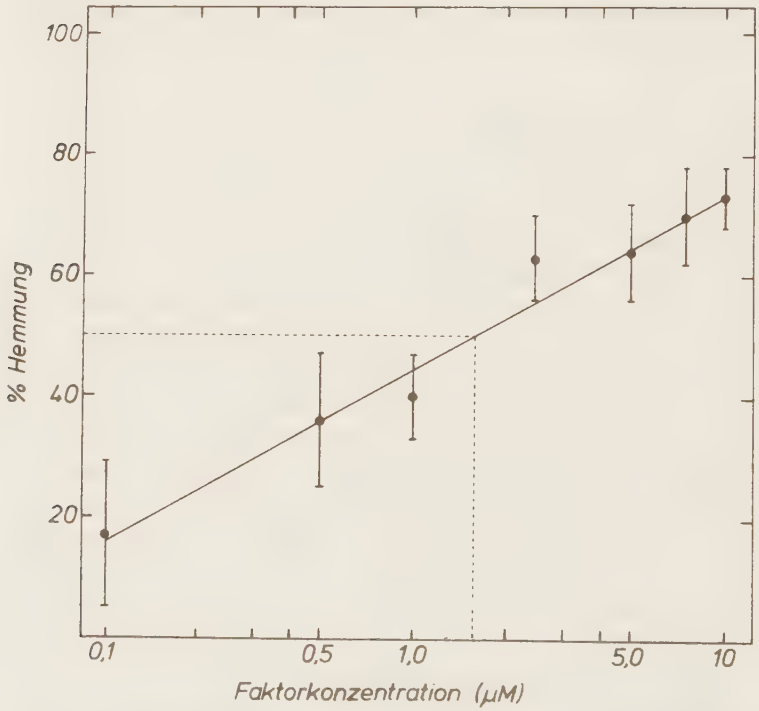


Abb. 2 Abhängigkeit der Hemmwirkung auf die Rosettenbildung von der Faktorkonzentration

Rosettentest: s.S.10. Es wurden Werte aus 3 Experimenten gemittelt. Bei den angegebenen Konzentrationen handelt es sich um Endkonzentrationen. Der I_{50} (Inhibitorkonzentration bei halbmaximaler Hemmung) wurde markiert.

Bei halblogarithmischer Darstellung ergibt sich eine Gerade; 50 % Hemmung der Rosettenbildung (I_{50}) erfolgt bei einer Faktorkonzentration von 1,6 µM.

1.2. Lokalisierung der Bindungsstelle und Beurteilung der Bindungsstärke des Faktors an seinen Wirkort

Die Fragestellungen lauten:

- Ist die Bindung des Faktors für eine Zellart spezifisch, an welche Zellart (Makrophagen oder Erythrozyten) bindet der Faktor?
- Wie stark ist die Bindung, ist nach Inkubation und anschließender Entfernung ungebundenen Faktors noch Hemmaktivität vorhanden?

Hierzu wurden folgende Versuchsbedingungen geschaffen:
1) 150 µl einer Makrophagensuspension (ca. $1{,}5 \times 10^6$/ml),
2) 150 µl einer 1 %-igen Erythrozytensuspension
wurden mit dem Faktor 10 min bei 4°C inkubiert. Es wurden jeweils zwei Faktorkonzentrationen getestet:
1) 6 µM Endkonzentration (submaximale Hemmung entspr. Abb. 2),
2) 17 µM Endkonzentration (sicher im Maximum der Hemmaktivität entspr. Abb. 2).

Als Kontrollen wurden Makrophagen und Erythrozyten ohne Faktorzusatz mitgeführt.
Nach der Inkubation wurden die Ansätze dreimal mit 1 ml Eagle's Medium versetzt, die Überstände nach 3 x 5 min Zentrifugation bei 150 g jeweils verworfen, um nicht - zellgebundenen Faktor zu entfernen. Nach diesen Waschungen liegt die Konzentration freien Faktors unter 10 nM, wo gemäß Abb. 2 keinerlei Hemmwirkung mehr auftritt.

Die Zellsedimente wurden mit Eagle's Medium auf ihr ursprüngliches Volumen gebracht und anschließend Aliquods von Makrophagen und Erythrozyten in üblicher Weise zur Rosettenbildung angesetzt. Es wurden drei Versuche dieser Art durchgeführt. Die Ergebnisse gibt Tab. 2 wieder:

Versuchsbedingungen	% Hemmung der Rosettenbildung gegenüber der Kontrolle (mit Angabe der Standardabweichung)
Makrophagen + 17 µM Faktor	55 % ± 6,6
Erythrozyten + 17 µM Faktor	42 % ± 7,4
Makrophagen + 6 µM Faktor	50 % ± 6,5
Erythrozyten + 6 µM Faktor	64 % ± 4,0

Tab. 2 Untersuchung zum Bindungsort und zur Bindungsstärke des Faktors (Versuchsbedingungen s. Text)

Es zeigt sich also, daß eine Bindung sowohl der Makrophagen als auch der Erythrozyten mit dem Faktor stattgefunden haben muß, die stabil genug ist, um die dreimalige Waschung zu überstehen. Der Faktor hat außerdem keinen spezifischen Reaktionspartner - Makrophagen oder Erythrozyten -, sondern es kommt jeweils zu einer Hemmung etwa gleichen Ausmaßes (um 50 %). Die Faktorkonzentration, ob submaximal (6 µM) oder maximal (17 µM) bedingt jeweils nur eine Hemmung der Rosettenbildung um 50 %, liegt also unter dem aus Abb. 2 zu erwartenden Wert.

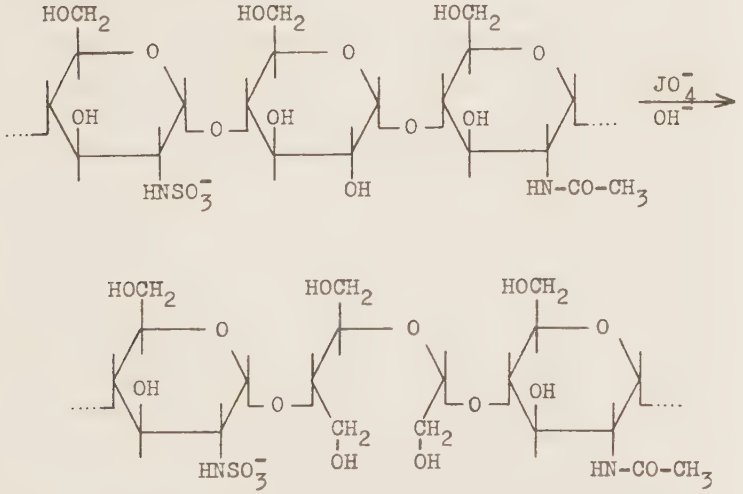
1.3. Versuch einer Aufhebung der Hemmwirkung durch Perjodatoxidation des Faktors

Nach Nagamura et al. (1981) soll es sich bei der Substanz um ein Glykosaminoglykan handeln (Modellstruktur von Glykosaminoglykanen siehe Reaktionsgleichung unten). Zu diesem Schluß kamen sie durch Analyse der Substanz

mit Hilfe spezifischer Farbreaktionen, UV- und Infrarotspektrometrie.

Zur Überprüfung der Hypothese untersuchte ich, ob die zellkontakthemmende Wirkung durch Perjodat-Oxidation wirkspezifischer Kohlenhydratkomponenten vermindert oder aufgehoben werden kann. Besitzt also der perjodatbehandelte Faktor noch Hemmwirkung?

Der Mechanismus der $NaJO_4$-Oxidation besteht in der Spaltung der Einfachbindung zwischen zwei benachbarten, OH-gruppentragenden C-Atomen (Foster et al., 1963):



Die beiden dabei entstehenden Hydroxymethylgruppen (primäre Alkohole) können durch überschüssiges $NaJO_4$ bei Raumtemperatur weiter zum Aldehyd bzw. zur Carbonsäure oxidiert werden, wobei eine langsame Ansäuerung des Mediums stattfindet (Manners und Wright, 1961), die ich auch beobachten konnte.

Es wurde folgendermaßen verfahren:

50 µl 50µM Faktor in Eagle's Medium wurden mit 20 µl 3 % Natriummetaperjodat ($NaJO_4$) und 10 µl 0,5 N NH_4OH für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Verbrauch des

überschüssigen $NaJO_4$ wurden 10 µl 10 % V/V Glyzerin und zur Neutralisierung des Mediums 0,5 N HCl zugefügt. Zur Kontrolle wurden statt Faktor 50 µl Eagle's Medium in gleicher Weise behandelt, um den Hemmeffekt der Reagenzien zu testen (Reagenzienleerwert).
Mit diesen beiden Ansätzen wurde dann der Rosettentest durchgeführt, wobei als weitere Kontrolle eine äquimolare Menge unbehandelten Faktors (2,5 µM Endkonzentration) untersucht wurde.

Versuchsbedingungen	% Hemmung der Rosettenbildung+	
	Versuch 1	Versuch 2
Reagenzienleerwert	0 %	0 %
$NaJO_4$-behandelter Faktor	70 %	83 %
unbehandelter Faktor	64 %	74 %

Tab 3 Untersuchung der Wirkung von Natriummetaperjodat auf den Hemmeffekt gereinigten Faktors

Versuchsbedingungen s. Text

+Bezogen auf die Basisrosettenbildung = 100 %

Das Ergebnis zeigt, daß auch $NaJO_4$-behandelter Faktor noch Hemmwirkung hat, und zwar in etwa gleichem Ausmaß wie unbehandelter. Dieses Resultat schließt aber die Struktur eines Glykosaminoglykans nicht aus, da die Perjodat-Behandlung bei Vorhandensein vieler N-Acetyl- und Sulfonylgruppen das Molekül unter Umständen nur geringfügig verändert (s. Reaktionsgleichung S. 15). Somit können die hemmenden Eigenschaften unbeeinflußt bleiben.

Das Ergebnis läßt also keinen endgültigen Rückschluß auf die chemische Natur der Substanz zu.

2. Untersuchungen zum Faktorgehalt im Serum von Diabetikern

2.1. Auftrennung der Seren mit Hilfe von Gelfiltration und Lokalisation der hemmenden Fraktionen

Dieser Teil der Arbeit befaßt sich mit der klinischen Bedeutung der Substanz.

Nagamura et al. (1981) hatten beobachtet, daß die Schaumfraktionen, aus denen sie den Faktor isolierten, bei Diabetikern in stärkerem Ausmaß vorhanden waren als bei Nicht-Zuckerkranken.

Meine Aufgabe war es nun, dieser Beobachtung durch systematische Untersuchungen nachzugehen.

Wie im Kap. "Material und Methoden" erläutert, stellte ich Serum-Gruppen (Pools) zusammen und trennte diese mit Hilfe der Gelfiltration auf. Abb. 3 zeigt exemplarisch ein UV-Spektrogramm eines filtrierten Diabetikerserums zusammen mit den Hemmaktivitäten der Fraktionen im Rosettentest.

Die in den Fraktionen 14 bis 20 auftretende starke UV-Absorption wird durch die hier erscheinenden hochmolekularen Proteine des Serums bedingt. Die Bedeutung des kleinen Peaks am Ende der Auftrennung (Fraktionen 48 - 50) ist unklar.

Der Kurvenverlauf zeigte im Vergleich zahlreicher Serumauftrennungen nur geringfügige Variationen (so zeigte der Gipfel bei Fraktion 48 - 50 kleine Schwankungen in der Höhe der Absorption, die aber in keinem Zusammenhang mit der jeweiligen Serumgruppe standen.

Es wurde nun jede dritte Fraktion mit Hilfe des Rosettentests auf ihre zelladhäsionshemmende Wirkung getestet.

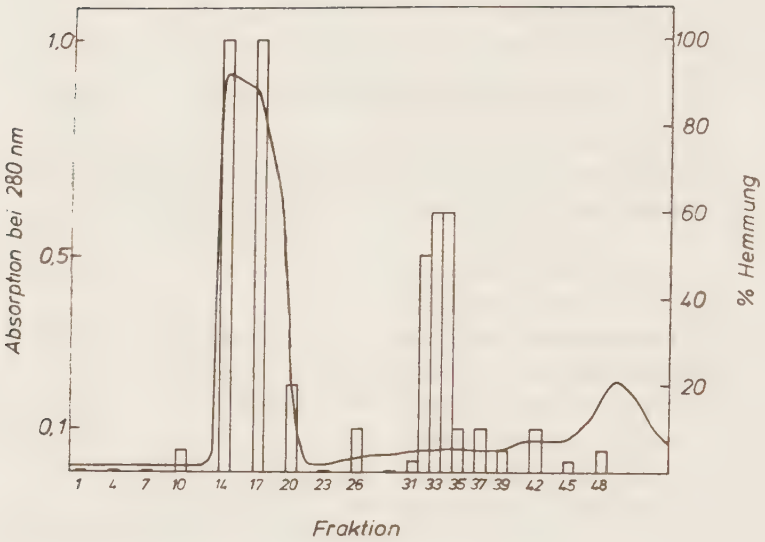


Abb. 3 UV-Spektrogramm fraktionierten Diabetikerserums und Histogramm der Hemmaktivitäten in den getesteten Fraktionen

4,5 ml Serum des Typs II(-) wurden in Fraktionen zu 5 ml getrennt, ihre Extinktion bei 280 nm gemessen und anschließend lyophilisiert. Jede 3. bis jede Fraktion (je 50 µl) wurden im Rosettentest auf ihre Hemmaktivität überprüft.

In den ersten 12 Fraktionen sind noch keine Serumbestandteile enthalten (der Frontmarker Dextran-Blau erscheint mit der ersten stark absorbierenden Fraktion). Es ist kein Effekt auf die Rosettenbildung vorhanden. In den Fraktionen 14 bis 20 kann ein Zellkontakt zwischen Makrophagen und Erythrozyten nicht zustande kommen, da die Erythrozyten durch die menschlichen Antikörper in diesen Fraktionen völlig agglutiniert sind. Die folgenden Fraktionen zeigen keine Hemmwirkung auf die Zelladhäsion, erst die Fraktionen 32 bis 34, in denen nach Lyophili-

sierung auch die Schaumbildung sichtbar wird, hemmen die Rosettenbildung zwischen den Makrophagen und Erythrozyten der Maus. Die nachfolgenden Fraktionen hemmen nicht.

Schaumbildung tritt immer in drei Fraktionen auf, die zwischen Nr.31 und 35 liegen. Sich mit der letzten Schaumfraktion überlappend folgen dann stets fünf Fraktionen, die bei der Lösung des Lyophilisats in 5 mM Phosphatpuffer-Eagle's-Medium alkalisch werden (Umschlag des Farbindikators Phenolrot nach lila) und einen weißen Niederschlag bilden. Über die Natur dieser schwerlöslichen Bestandteile und die Herkunft des alkalischen Milieus (pH um 8,6) ist nichts bekannt. Der Versuch einer Neutralisierung des pH mit 1 N HCl nach Abzentrifugation des Niederschlages bei 10000 g war immer nur kurzfristig von Erfolg; im Verlauf einer Stunde wurden die jeweiligen Fraktionen wieder alkalisch. Deshalb wurden alle zu untersuchenden Fraktionen mit Tricin-Puffer in einer Endkonzentration von 40 mM versetzt, woraufhin der pH-Wert stabil im neutralen Bereich blieb. Eine spezifische Wirkung des Tricins auf die Rosettenbildung konnte mit Kontrollversuchen ausgeschlossen werden.

2.2. Bestimmung der Faktorkonzentration bei Diabetikern verschiedenen Typs und verschiedener Stoffwechsellage im Vergleich zu einer Kontrollgruppe

Es wurden fünf Gruppen getestet:

1. Serum-Pool einer nicht diabetischen Kontrollgruppe (K),
2. Serum-Pool mit Insulin behandelter Diabetiker
   a) mit schlechter Stoffwechsellage (Typ I(-)),
   b) mit guter Stoffwechsellage (Typ I(+)),
3. Serum-Pool von mit oralen Antidiabetika oder Diät behandelten Diabetikern
   a) mit schlechter Stoffwechsellage (Typ II(-)),
   b) mit guter Stoffwechsellage (Typ II(+)).

Aliquods der jeweils drei schaumbildenden Säulenfraktionen wurden gemischt und die fünf Gruppen dann auf ihren Einfluß auf die Rosettenbildung getestet. Es wurden auch die Verdünnungen 1:3 und 1:9 untersucht, um zu gewährleisten, daß noch Proportionalität zwischen Konzentration und Wirkung besteht. Das Ergebnis dieser Testreihen zeigt Abb. 4.

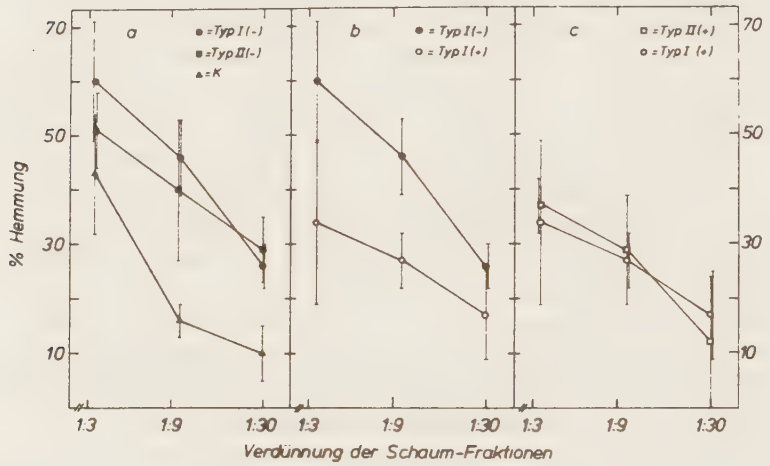


Abb. 4 Hemmung der Rosettenbildung durch vier verschiedene Serumpools von Diabetikern unterschiedlichen Typs und Stoffwechsellage sowie durch Serum nicht diabetischer Personen in drei Konzentrationen

50 µl der Schaumfraktionen wurden in den Rosettentest (s.S. 10) eingesetzt, so daß sich nach Pufferung mit 40 mM Tricin die Endverdünnungen 1:3,3, 1:9,9 und 1:29,7 ergeben.
Die Zahlen (mit Angabe der Standardabweichung) sind Mittelwerte aus durchschnittlich 6 Experimenten pro Serumgruppe und Verdünnung.
Halblogarithmische Darstellung

Der Übersichtlichkeit wegen werden nicht alle fünf Hemmkurven in einer Darstellung gezeigt, sondern es werden Bezugsgruppen gebildet. In Abb. 4 a sind die Hemmaktivi-

täten der Seren schlecht eingestellter Diabetiker (Typ I (-) und II(-)) im Vergleich zu der des Kontrollserums (K) dargestellt. Die Hemmeffekte der Verdünnung 1:3,3 liegen hier recht dicht beieinander. Die Varianzanalyse erbrachte einen signifikanten Unterschied zwischen K und Typ I (-),($p < 0,05$). Als mittlerer Wert läßt sich Typ II(-) (1:3,3) weder von K noch von Typ I(-) trennen. Bei der Untersuchung der Verdünnungen 1:9,9 und 1:29,7 ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen dem Kontrollserum einerseits und Typ I und II(-) auf der anderen Seite. Das Kontrollserum hemmt deutlich weniger als Typ I und II(-). Die Seren schlecht eingestellter insulin- versus nicht insulinabhängiger Diabetiker haben etwa die gleiche Hemmwirkung.

In Abb. 4 b werden die Serum-Hemmaktivitäten insulinabhängiger Diabetiker mit guter Stoffwechsellage (Typ I (+)) denen mit ungenügender Einstellung (Typ I(-)) gegenübergestellt. Typ I(+) hemmt die Rosettenbildung in signifikant geringerem Ausmaß als Typ I(-) ($p < 0,01$). Der Vergleich insulinpflichtig versus nicht insulinbehandelt bringt auch bei gut eingestellten Diabetikern keinen Unterschied (Abb. 4 c).

Zusammenfassend kann gesagt werden (s. Abb. 5): Serum von Diabetikern mit schlechter Stoffwechsellage hemmt die Zelladhäsion von Maus-Makrophagen mit Maus-Erythrozyten etwa vierfach mehr als Kontrollserum nicht diabetischer Personen.

Serum von Diabetikern mit guter Stoffwechsellage hemmt etwa gleich stark wie das Kontrollserum. Die Diabeteseinstellung scheint also eine die Hemmwirkung beeinflussende Größe zu sein, wohingegen die Behandlungsart, resp. der Diabetes-Typ, keine Auswirkung auf die Höhe der Faktorkonzentration zu haben scheint.

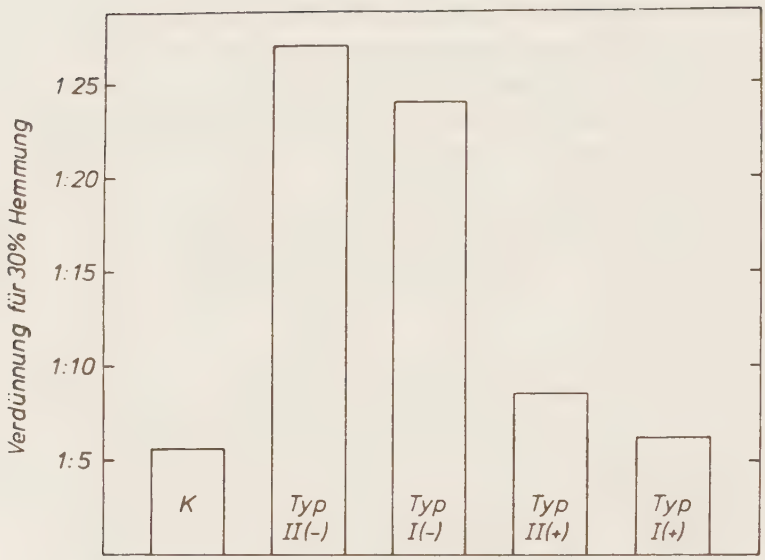


Abb. 5 Verdünnung der Schaumfraktionen bei einer 30 %-igen Hemmung der Rosettenbildung (I_{30})

Die I_{30}-Werte wurden aus Abb. 4 zeichnerisch bestimmt; Die Werte für eine 50 %-ige Hemmung konnten nicht ermittelt werden, da die Gruppen K, Typ I(+) und Typ II(+) diese nicht erreichen.

DISKUSSION

Basis dieser Arbeit ist die von Nagamura et al. (1981) gemachte Beobachtung, daß bestimmte Fraktionen aus Diabetikerserum die Zelladhäsion zwischen Mausmakrophagen und Mauserythrozyten hemmen.

Die vorliegende Dissertation hat zwei Schwerpunkte: Zum einen wird versucht, die gereinigte Substanz näher zu charakterisieren, zum anderen werden Seren von verschiedenen Diabetikergruppen in bezug auf ihren Gehalt an Hemmfaktor verglichen.

Zunächst mußte der Konzentrationsbereich des Faktors gefunden werden, in dem Konzentration und Wirkung proportional sind. Das Ergebnis, daß eine Inhibitorkonzentration von nur 1,6 µM unter den angegebenen Versuchsbedingungen eine 50 %-ige Hemmung der Rosettenbildung bewirkt, zeigt, daß es sich um einen potenten Hemmstoff handelt.

Mit Hilfe der Bindungsstudie (Erg.1.2.) konnte gezeigt werden, daß die Substanz sowohl an Makrophagen als auch an die Erythrozyten bindet. Da auch nach gründlicher Entfernung freien Faktors durch mehrfaches Waschen der Zellen noch eine Hemmwirkung auf die Zelladhäsion auftritt, liegt eine starke Bindung zwischen der Substanz und der Zelloberfläche vor. Die Dissoziation des zellgebundenen Inhibitors erscheint gering.

Da der Faktor sowohl an Makrophagen als auch an Erythrozyten bindet, könnte auch eine Agglutination der beiden Zelltypen erwartet werden. Da dies nicht der Fall ist, kann auf einen monovalenten Bindungstyp geschlossen werden. Die Bindungsstellen für den Faktor müßten dann auf Erythrozyten und Makrophagen identisch sein. Inwieweit die Hemmwirkung einen stereospezifischen Rezeptor im Sinne des Schlüssel-Schloß-Prinzips erfordert, muß offen bleiben. Eine unspezifische Hemmung könnte durch Abschirmung von Oberflächenladungen zwischen Makrophagen und Erythrozyten ausgeübt werden. Eine andere Möglichkeit wäre die unspezifische Bindung des Inhibitors über Wasser-

stoffbrücken an die Glykocalix der Zellen, so daß es zur sterischen Behinderung der Rosettenbildung kommt.

Daß die Substanz Ladungen trägt, haben Nagamura et al. (1981) postuliert; aufgrund des Nachweises von Sulfat- und N-Acetylgruppen stellt er ihre Struktur in die Nähe des Heparins. Bezüglich der chemischen Natur des Hemmstoffes ergeben sich keine zusätzlichen Informationen. Die Modifikation des vermuteten Glykosaminoglykans mittels Perjodat-Oxidation brachte keine Verminderung seiner Hemmwirkung. Dies schließt aber die Struktur eines Polysaccharids nicht aus, da die Veränderungen des Moleküls das hemmende Prinzip unbeeinflußt lassen können. Mit einem Molekulargewicht von ca. 5000 d ist die Substanz leichter als Insulin (6000 d und schwerer als Glukagon (3500 d) (Nagamura et al., 1981).

Unabhängig von der Natur des Stoffes war von besonderem Interesse, ob die Hemmsubstanz in Abhängigkeit vom Diabetes-Typ und von der Stoffwechsellage des Diabetikers in unterschiedlichem Maße vorhanden ist. Hierzu war zunächst die Untersuchung von Einzelseren geplant. Da sich aber eine Trennung der Seren auf kleinen Säulen mit kurzer Laufzeit als ungenügend erwies, mußten Serumgruppen (Pools) entsprechend den im Kap. "Material und Methoden" erläuterten Kriterien gebildet werden. Das Mischen von Einzelseren birgt den Nachteil, daß Unterschiede verwischt werden können, andererseits ist aber auch die Schaffung artefizieller Effekte nicht auszuschließen; so könnte ein einziges Serum von zehn eine so große Hemmpotenz haben, daß, obwohl die übrigen Seren nicht hemmen, eine Wirkung vorgetäuscht wird. Dieser Nachteil muß - zumal er unwahrscheinlich ist - in Kauf genommen werden.

In Hinblick auf die zur Zeit stark diskutierte Immunpathogenese des Insulinmangeldiabetes galt unser Interesse der Frage, ob beide Diabetes-Typen oder vielleicht nur der Typ I diesen Faktor besitzen. Eine Wirkung des Faktors auf das Immunsystem ergibt sich bereits aus dem von mir verwendeten Testsystem, bei dem immunologisch aktive Zellen in ihrer Kontaktfähigkeit zu anderen Zellen

behindert werden.

In einer Fülle von Arbeiten wird nach möglichen Defekten in der Körperabwehr beim Typ I-Diabetiker gesucht; so werden teils normale (MacCuish et al., 1974a, Hann et al., 1976, Selam et al., 1979), teils verringerte Gesamtzahlen von T-Lymphozyten (Cattaneo et al., 1976) beschrieben. Schließlich fanden Müller et al. (1980) eine Verminderung einer Untergruppe von T-Lymphozyten bei konstanter Gesamtzahl. Unabhängig von der Zahl beschreiben MacCuish et al. (1974b) auch eine Dysfunktion der T-Lymphozyten.

Eine Dysfunktion der T-Zellen nicht als ätiologischer Faktor, sondern als reversibles Phänomen in Abhängigkeit von der Stoffwechsellage fanden Delespesse et al. (1974) und MacCuish et al. (1974a). Selam et al. (1979) beschreiben verringerte T- und B-Lymphozyten-Anteile bei konstanter Gesamtzahl nur bei schlecht eingestellten Diabetikern.

Bei der Untersuchung frisch diagnostizierter Diabetiker des Typs I wiesen Buschard et al. (1980) eine verringerte Aktivität der Suppressor-T-Lymphozyten nach und Sensi et al. (1981) berichten von einer Erhöhung der Killer-Zellzahl. Beide Ergebnisse weisen in die gleiche Richtung, nämlich einer erhöhten immunologischen Aktivität zu Beginn der Erkrankung.

In engerem Zusammenhang mit meinen Untersuchungen stehen die Arbeiten von Pozzilli et al. (1980) und Cattaneo et al. (1980). Beide fanden eine Hemmwirkung des Serums insulinabhängiger Diabetiker auf die Rosettenbildung normaler menschlicher Lymphozyten mit Schafserythrozyten (sog. E-Rosetten). Eine Fraktionierung des Serums zur Isolierung der Substanz erfolgte nicht. Im Zusammenhang mit der Immunpathogenese halten sie es für möglich, daß Immunkomplexe oder Antikörper Verursacher dieses Hemmeffektes sind. Sie testeten allerdings keine Seren von Typ II-Diabetikern.

Meine Untersuchungen ergaben, daß der Gehalt an Hemmfaktor im Serum insulin- und nicht insulinpflichtiger Diabetiker etwa gleich ist. Es kann daher nicht entschieden

werden, inwieweit der von mir untersuchte Faktor für die von Pozzilli und Cattaneo beschriebenen Beobachtungen verantwortlich zu machen ist.

Neben Störungen der Lymphozytensubpopulationen sind für Diabetiker auch Beeinträchtigungen der Phagozyten bekannt (Nolan et al., 1978). Auch diese Störungen sind besonders deutlich bei schlecht eingestellter diabetischer Stoffwechsellage. Da der Schaumfaktor im Testsystem die Aktivität von Peritonealmakrophagen hemmt, erscheint ein Zusammenhang möglich.

Die Bestimmung des Hemmfaktorgehaltes unter Berücksichtigung der Stoffwechselsituation erbrachte einen ca. vierfach höheren Anteil in Seren schlecht eingestellter Diabetiker. Der Faktorgehalt des Serumpools gut eingestellter Diabetiker entspricht dem der Kontrollgruppe. Der Schaumfaktor stellt demnach einen neuen Parameter für die Stoffwechseleinstellung diabetischer Patienten dar.

Es ist bekannt, daß sich das Blut von Diabetikern mit hohem Blutzuckerniveau nicht nur im Glukosespiegel von dem normoglykämischer Personen unterscheidet. Auch andere Substanzen sind in ihrer Konzentration erhöht oder erniedrigt. Alle Änderungen sind in Hinsicht auf eine mögliche Beteiligung bei der Entstehung vaskulärer Spätkomplikationen von Interesse. In der Diskussion sind zur Zeit neben dem erhöhten Blutglukosespiegel u.a. das Insulin selbst, die low density Lipoproteine und das Wachstumshormon (siehe Steiner, 1981). So berichten Ledet et al. (1976) und Ledet (1981) über einen Faktor (oder Faktoren) im Serum von Diabetikern, der eine Proliferation von aortalen Mediazellen in der Kultur bewirkt. Hierbei könnte es sich möglicherweise um das Wachstumshormon handeln, das bei Diabetikern Typ I erhöht ist (Lundbaek et al., 1970). Koschinsky et al. (1980 und 81) fanden einen niedermolekularen Wachstumsfaktor für menschliche Fibroblasten und Gefäßzellen im Serum von Diabetikern des Typs II mit schlechter Stoffwechsellage. Bei gut eingestellten Diabetikern sowie bei Kontrollpersonen wurde der proli-

ferative Effekt nicht gefunden. Zur Natur des Stoffes (oder einer Kombination von Substanzen) kann auch hier noch keine Aussage gemacht werden. Da der Effekt mit Diabetiker-Serum Typ II gefunden wurde, scheidet das Wachstumshormon, dessen Konzentration beim Typ II nicht erhöht ist, aus.

Zum Schluß sei noch ein weiterer Aspekt genannt, der im Zusammenhang mit der Spätfolge der diabetischen Mikroangiopathie steht. Berenson et al. (1970) und Ginsberg et al. (1981) fanden einen veränderten und erhöhten Anteil von Glykosaminoglykanen im durch Diabetes geschädigten Nierengewebe. Erhöhte Gewebekonzentrationen bedingen möglicherweise auch erhöhte Blutspiegel, so daß die hier beschriebene Substanz in Verbindung mit den zitierten Gewebsveränderungen stehen könnte.

Die Komplexität der Zusammenhänge macht es zur Zeit unmöglich, den von Nagamura et al. (1981) entdeckten und von mir hier näher charakterisierten Faktor in seiner pathologischen Bedeutung endgültig zu beurteilen. Weiterreichende Erkenntnisse könnten durch das Studium der Faktorwirkung auf die Funktion menschlicher Lymphozyten und Makrophagen gewonnen werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Nachdem Nagamura et al. (1981) einen Faktor im Serum von Diabetikern entdeckt haben, der in der Lage ist, eine zellkontakthemmende Wirkung auf die Zelladhäsion zwischen Makrophagen und Erythrozyten der Maus auszuüben, ist es Gegenstand der vorliegenden Arbeit, diese Substanz näher zu charakterisieren.

Der Faktor findet sich in Serum-Fraktionen, die sich nach Gefriertrocknung durch vermehrte Schaumbildung von denen aus Nicht-Diabetiker-Serum unterscheiden.

Mit Hilfe des Rosettentests - der spontanen Zelladhäsion zwischen Peritonealmakrophagen der Maus und autologen Erythrozyten - wurden die Fraktionen, die eine vermehrte Schaumbildung zeigten, näher untersucht. Es wurde übereinstimmend mit Nagamura et al. (1981) gefunden, daß von den Schaumfraktionen aus Diabetiker-Serum eine hemmende Wirkung auf die Rosettenbildung ausgeübt wird.

Weiterhin wurde versucht, diese ersten Ergebnisse zu quantifizieren. Hierzu wurde zunächst die aus den Schaumfraktionen von Nagamura et al. (1981) gereinigte Substanz - nach seinen Analysen ein Glykosaminoglykan mit einem Molekulargewicht von 5000 d - auf die Stärke ihrer Wirkung geprüft.

Die Substanz erwies sich als potenter Inhibitor der Rosettenbildung; 50 %-ige Hemmung wurde bei einer Faktorkonzentration von 1,6 µM erreicht.

Die Substanz hemmt den Zellkontakt sowohl durch Bindung an die Makrophagen als auch an die Erythrozyten, wobei sich die Bindung als sehr stark erwies, da auch nach gründlicher Entfernung freien Faktors noch eine 70 %-ige Hemmwirkung auftrat.

Hinsichtlich einer möglichen klinischen Bedeutung der Substanz wurden Serumgruppen verschiedener Diabetestypen und Stoffwechseleinstellungen gebildet.

Die Untersuchung der aus den Serum-Pools gewonnenen Schaumfraktionen mit Hilfe des Rosettentests ergab, daß der Gehalt an Hemmfaktor im Serum von Typ I und Typ II-

Diabetikern etwa gleich groß ist. Hingegen scheint die Stoffwechselsituation die Menge vorhandenen Faktors zu regulieren. Es wurde ein mehr als vierfach höherer Anteil in Seren schlecht eingestellter Diabetiker gefunden. Der Faktorgehalt der Serum-Pools gut eingestellter Diabetiker unterscheidet sich nicht von dem der Kontrollgruppe.

Die klinisch-pathologische Bedeutung der Substanz ist zur Zeit noch unbekannt. In der Diskussion werden mögliche Ansätze besprochen.

LITERATURVERZEICHNIS

AMINOFF,D., VOR DER BRUEGGE, W.F., BELL, W.C., SARPOLIS,K., WILLIAMS, R. (1977)
Role of sialic acid in survival of erythrocytes in the circulation: Interaction of neuraminidase-treated and untreated erythrocytes with spleen and liver at the cellular level.
Proc. natl. Acad. Sci. 74, 1521 - 1524

BERENSON, G.S., RUIZ, H., DALFERES, E.R., DUGAN, F.A., RADHAKRISHNAMURTHY, B. (1970)
Acid mucopolysaccharide changes in diabetic kidneys.
Diabetes 19, 161 - 170

BOTTAZZO, G.F., DONIACH, D. (1976)
Pancreatic autoimmunity and HLA antigens.
Lancet II, 800

BUSCHARD, K., MADSBAD, S., RYGAARD, J. (1980)
Depressed suppressor cell activity in patients with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus.
Clin. exp. Immunol. 41, 25 - 32

CAHILL, G.F.,McDEVITT, H.O. (1981)
Insulin-dependent diabetes mellitus: The initial lesion.
N. Engl. J. Med. 304, 1454 - 1465

CATTANEO, R., SAIBENE, V., POZZA, G. (1976)
Peripheral T-lymphocytes in juvenile-onset diabetics (JOD) and in maternity-onset diabetics (MOD).
Diabetes 25, 223 - 226

CATTANEO, R., SAIBENE, V., PESCATORI, D., MERSI, A., POZZA, G. (1980)
Factors affecting E-rosette forming ability in peripheral lymphocytes of insulin dependent diabetics.
Diabetologia 18, 115 - 119

CHAMPSAUR, H., DUSSAIX, E., SAMOLYK, D., FABRE, M., BACH, C., ASSAN, R. (1980)
Diabetes and Coxsackie virus B5 infection.
Lancet I, 251

CRAIGHEAD, J.E. (1979)
Does insulin dependent diabetes mellitus have a viral etiology?
Hum. Pathol. 10, 267 - 278

CUDWORTH, A.G. (1978)
Type I diabetes mellitus.
Diabetologia 14, 281 - 291

DELESPESSE, G., DUCHATEAU, J., BASTENIE, P.A., LAUVAUX, J.P., COLLET, H., GOVAERTS, A. (1974)
Cell-mediated immunity in diabetes mellitus.
Clin. exp. Immunol. 18, 461 - 467

DOBERSEN, M.J., SCHARFF, J.E., GINSBERG-FELLNER, F., NOTKINS, A.L. (1980)
Cytotoxic autoantibodies to beta cells in the serum of patients with insulin-dependent diabetes mellitus.
N. Engl. J. Med. 303, 1493 - 1498

FAJANS, S.S. (1981)
Etiologic aspects of types of diabetes.
Diabetes Care 4, 69 - 75

FOSTER, A.B., HARRISON, R., INCH, T.D., STACEY, M., WEBBER, J.M. (1963)
Aminosugars and related compounds. Part IX.
Periodate oxidation of heparin and some related substances.
J. Chem. Soc. 1963, 2279 - 2287

GALILI, U., GALILI, N., VANKY, F., KLEIN, E. (1978)
Natural species-restricted attachment of human and murine T-lymphocytes to various cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 2396 - 2400

GAMBLE, D.R., TAYLOR, K.W., CUMMING, H. (1973)
Coxsackie viruses and diabetes mellitus.
Brit. Med. J. IV, 260 - 262

GEPTS, W. (1965)
Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus.
Diabetes 14, 619 - 633

GINSBERG, H., KIMMERLING, G., OLEFSKY, J.M., REAVEN, G.M. (1975)
Demonstration of insulin resistance in maturity onset diabetic patients with fasting hyperglycemia.
J. Clin. Invest. 55, 454 - 460

GINSBERG, L.C., WYSE, B.M., CHANG, A. (1981)
Analysis of glycosaminoglycan from diabetic and normal chinese hamster cells.
Diabetes 30, 393 - 395

GONEN, B., RUBENSTEIN, A.H. (1978)
Haemoglobin A1 and diabetes mellitus.
Diabetologia 15, 1 - 8

HANN, S., KAYE, R., FALKNER, B. (1976)
Subpopulations of peripheral lymphocytes in juvenile diabetes.
Diabetes 25, 101 - 103

HEPP, K.D. (1981)
Zur Pathogenese des Diabetes mellitus.
Der Internist 22, 183 - 186

IRVINE, W.J., McCALLUM, C.J., GRAY, R.S., CAMPBELL, C.J.
DUNCAN, L.J.P., FARQUHAR, J.W., VAUGHAN, H., MORRIS, P.J. (1977)
Pancreatic islet-cell antibodies in diabetes mellitus correlated with the duration and type of diabetes, coexistent autoimmune disease, and HLA type.
Diabetes 26, 138 - 147

IRVINE, W.J. (1979)
Immunological aspects of diabetes mellitus.
In: CAMERINI-DAVALOS, R.A., HANOVER, B. (Eds)
Treatment of early diabetes.
Plenum Press, New York, S. 147

JONDAL, M., KLEIN, E., YEFENOF, E. (1975)
Surface markers on human B and T lymphocytes.
VII. Rosette formation between peripheral T lymphocytes and lymphoblastoid B-cell lines.
Scand. J. Immunol. 4, 259 - 266

KOLB, H., KOLB-BACHOFEN, V. (1978)
A lectin- like receptor on mammalian macrophages.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 678 - 683

KOLB, H., KOLB-BACHOFEN, V., SCHLEPPER-SCHÄFER, J. (1979)
Cell contacts mediated by D-galactose-specific lectins on liver cells.
Biol. Cell. 36, 301 - 308

KOLB, H., STROHEKER, M., BIENER, J., GRÜNEKLEE, D., MÜNTEFERING, H., GRIES, F.A. (1980)
Analysis of the persistence of islet cell antibodies in type I diabetic children.
In: PINCHERA, A., DONIACH, D., FENZI, G.F., BASCHIERI, L. (Eds) Autoimmune aspects of endocrine disorders.
Academic Press, London

KOLB, H., GRIES, F.A. (1981)
Diabetes und Autoimmunität.
Internistische Welt 1, 12 - 19

KOSCHINSKY, T., BÜNTING, C.E., SCHWIPPERT, B., GRIES, F.A. (1980)
Increased growth stimulation of fibroblasts from diabetics by diabetic serum factors of low molecular weight.
Atherosclerosis 37, 311 - 317

KOSCHINSKY, T., BÜNTING, C.E., SCHWIPPERT, B., GRIES, F.A. (1981)
Regulation of diabetic serum growth factors for human vascular cells by the metabolic control of diabetes m.
Atherosclerosis 39, 313 - 319

LEDET, T., FISCHER DZOGA, K., WISSLER, R.W. (1976)
Growth of rabbit aortic smooth-muscle cells cultured in media containing diabetic and hyperlipemic serum.
Diabetes 25, 207 - 215

LEDET, T. (1981)
Diabetic macroangiopathy and growth hormone.
Diabetes 30, Suppl. 2, 14 - 17

LUNDBAEK, K., JENSEN, V.A., OLSEN, T.S., ØRSKOV, H., CHRISTENSEN, N.J., JOHANSEN, K., HANSEN, A.P., ØSTERBY, R. (1970)
Diabetes, diabetic angiopathy, and growth hormone.
Lancet, July 18, 131 - 133

MacCUISH, A.C., URBANIAK, S.J., CAMPBELL, C.J., DUNCAN, L., IRVINE, W.J. (1974a)
Phytohemagglutinin transformation and circulating lymphocyte subpopulations in insulin-dependent diabetic patients.
Diabetes 23, 708 - 712

MacCUISH, A.C., JORDAN, J., CAMPBELL, C.J., DUNCAN, L., IRVINE, W.J. (1974b)
Cell-mediated immunity to human pancreas in diabetes m.
Diabetes 23, 693 - 697

MANNERS, D.J., WRIGHT, A. (1961)
α-1,4-Glucosans Part XII: End group assay of glycogens by oxidation with sodium metaperiodate.
J. Chem. Soc. 1961, 2681 - 2684

MAYER, E.P., CHEN, W.-Y., DRAY, S., TEODORESCU, M. (1978)
The identification of six mouse lymphocyte subpopulations by their natural binding of bacteria.
J. Immunol. 120, 167 - 173

MÜLLER, R., KOLB, H., KUSCHAK, D., JÖRGENS, V., GRIES, F.A. (1980)
Analysis of T-lymphocyte subpopulations in juvenile-onset diabetics.
Clin. exp. Immunol. 39, 130 - 135

NAGAMURA, Y., KOLB, H. (1980)
Presence of a lectin-like receptor for D-galactose on rat peritoneal macrophages.
Febs letters 115, 59 - 62

NAGAMURA, Y., KOLB, H. (1981)
Rat peritoneal macrophages express two different lectin-like receptors on the cell surface.

In: BØG-HANSEN, T.C. (Ed): Lectins - Biology, Biochemistry, clinical biochemistry, Vol.1.
DeGruyter, Berlin, S. 33

NAGAMURA, Y., KORTHAUS, G., KOLB, H., GRIES, F.A., DROST,H. (1981)
Novel glycosaminoglycan in sera of diabetics.
Lancet I, 665 - 666

NATIONAL DIABETES DATA GROUP (1979)
Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance.
Diabetes 28, 1039 - 1057

NERUP, J., PLATZ, P., ORTVED ANDERSEN, O. (1974)
HL-A antigens and diabetes mellitus.
Lancet II, 864 - 866

NOLAN, C.M., BEATY, H.N., BAGDADE, J.D. (1978)
Further characterization of the impaired bacterial function of granulocytes in patients with poorly controlled diabetes.
Diabetes 27, 889 - 894

OLEFSKY, J.M., REAVEN, G.M. (1974)
Decreased insulin binding to lymphocytes from diabetic patients.
J. Clin. Invest. 54, 1323 - 1328

OLEFSKY, J.M., KOLTERMAN, O.G. (1981)
Mechanisms of insulin resistance in obesity and non-insulin-dependent (type II) diabetes.
Am. J. Med. 70, 151 - 168

POZZILLI, P., DI MARIO, U., JAVICOLI, M., MENZINGER, G., ANDREANI, D. (1980)
Inhibition of allogeneic lymphocyte E-rosettes induced by sera from newly diagnosed type I diabetics.
Acta endocrinologica 93, 49 - 53

PYKE, D.A. (1979)
Diabetes: The genetic connections.
Diabetologia 17, 333 - 343

REAVEN, G.M., BERNSTEIN, R., DAVIS, B., OLEFSKY, J.M. (1976)
Non-ketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin resistance?
Am. J. Med. 60, 80 - 88

SCHLIACK, V. (1954)
Mangelernährung und Diabetesmorbidität.
Z. Klin. Med. 151, 382 - 396

SELAM, J.L., CLOT, J., ANDARY, M., MIROUZE, J. (1979)
Circulating lymphocyte subpopulations in juvenile insulin-dependent diabetes.
Diabetologia 16, 35 - 40

SENSI, M., POZZILLI,P., GORSUCH,A.N., BOTTAZZO,G.F. CUDWORTH,A.G. (1981)
Increased killer cell activity in insulin-dependent (type I) diabetes mellitus.
Diabetologia 20, 106 - 109

STEINER,G. (1981)
Diabetes and atherosclerosis.
Diabetes 30, Suppl.2, 1 - 7

WEBER,E. (1972)
Grundriß der biologischen Statistik.
G. Fischer-Verlag, Stuttgard

YOON,J.-W., ONODERA,T., NOTKINS,A.L. (1978)
Virus-induced diabetes m.: XV. Beta-cell damage and insulin-dependent hyperglycemia in mice infected with Coxsackie virus B_4.
J. Exp. Med. 148, 1068 - 1080

YOON,J.-W., AUSTIN,M., ONODERA,T., NOTKINS,A.L. (1979)
Virus-induced diabetes m.: Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis.
N. Engl. J. Med. 300, 1173 - 1179

ZAALBERG,O.B. (1964)
A simple method for detecting single antibody-forming cells.
Nature 202, 1231

Mein Dank gilt Herrn Prof. H. Kolb und Herrn Dr. Y. Nagamura für die Überlassung des Themas und für anregende Diskussionen.
Bei Herrn Prof. F.A. Gries und Herrn Prof. Kolb bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.
Herzlichen Dank auch Frau G. Dzulko und Frau G. Korthaus, die mich mit technischen Tips unterstützten.
Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Frau K. Dopstadt und Herrn A. Morguet, die mir bei den statistischen Untersuchungen behilflich waren, sowie bei Herrn Dr. Scherff und Herrn Priv.-Doz. Dr. Koschinsky für ihre Unterstützung bei der Beschaffung der Blutproben.

Lebenslauf

Geboren wurde ich am 8.8.1953 in Lüdenscheid als Tochter der Eheleute Marianne und Dr. Gerhart Hoppe.
Ab 1960 besuchte ich die Grundschule und wechselte dann zur Ricarda-Huch-Schule in Hagen, an der ich 1972 das Abitur machte.
Von 1972-73 wurde ich zur Krankenpflegehelferin am Evg. Krankenhaus Hagen-Haspe ausgebildet.
1973 begann ich das Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum, das ich 1978 mit dem Diplom abschloß.
In jenem Jahr begann ich auch das Medizinstudium an der Universität Düsseldorf. Dort legte ich 1982 das zweite Staatsexamen ab.
Zur Zeit befinde ich mich im Praktischen Jahr an einem Wuppertaler Krankenhaus; im Frühjahr 1983 werde ich es voraussichtlich mit dem dritten Staatsexamen abschließen.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353